

9-17-04

IFW



ATTORNEY DOCKET NO.: 71357

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : LEPPICH et al.
Serial No : 10/808,025
Confirm No : 4793
Filed : March 24, 2004
For : BAKING OVEN AND...
Art Unit : 1761
Examiner : N/A
Dated : September 16, 2004

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

PRIORITY DOCUMENT

In connection with the above-identified patent application, Applicant herewith submits a certified copy of the corresponding basic application filed in

Germany

Number: 103 16 503.7

Filed: 9/April/2003

the right of priority of which is claimed.

Respectfully submitted
for Applicant(s),

By:

John James McGlew

Reg. No.: 31,903

McGLEW AND TUTTLE, P.C.

JJM:jms

Enclosure: - Priority Document

71357.8



September 16, 2004
SCARBOROUGH STATION
SCARBOROUGH, NEW YORK 10510-0827
(914) 941-5600

NOTE: IF THERE IS ANY FEE DUE AT THIS TIME, PLEASE CHARGE IT TO OUR DEPOSIT ACCOUNT NO. 13-0410 AND ADVISE.

I HEREBY CERTIFY THAT THIS CORRESPONDENCE IS BEING DEPOSITED WITH THE UNITED STATES POSTAL SERVICE AS EXPRESS MAIL, REGISTRATION NO. EV436439608US IN AN ENVELOPE ADDRESSED TO: COMMISSIONER FOR PATENTS, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313-1450, ON September 16, 2004

McGLEW AND TUTTLE, P.C., SCARBOROUGH STATION,
SCARBOROUGH, NEW YORK 10510-0827

By: Yonina Fonte Date: September 16, 2004

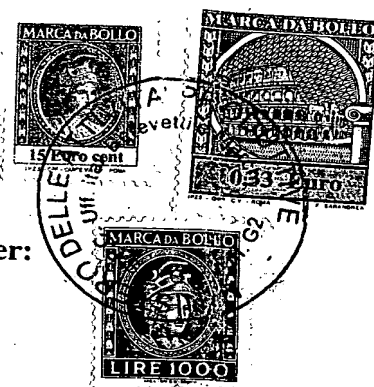


Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
Invenzione Industriale N° FI2003 A 000077 del 26.03.2003

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**

li 2 AGO. 2004

IL FUNZIONARIO

dr. Paolo GALLOPPO

Paolo Galloppo

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

MODULO A

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITA' AL PUBBLICO

marca
da
bollo

A. RICHIEDENTE (I)

N.G.

1) Denominazione ACTIS ACTIVE SENSORS S.R.L. SR
Residenza FIRENZE - VIA MASSONI 6/9 codice 02286500489

2) Denominazione _____
Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Dr. Luisa BACCARO MANNUCCI ed altri cod. fiscale _____
denominazione studio di appartenenza UFFICIO TECNICO ING. A.MANNUCCI S.R.L.
via della Scala n. 4 città Firenze cap 50123 (prov) FI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

c/o UFFICIO TECNICO ING. A.MANNUCCI S.R.L.
via della Scala n. 4 città Firenze cap 50123 (prov) FI

D. TITOLO

classe proposta (sez/ci/sci)

gruppo/sottogruppo

☐ / ☐

"METODO PER L'INDAGINE ECOGRAFICA TRAMITE MEZZI DI CONTRASTO"

ANTICIPATA ACCESSIBILITA' AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒SE ISTANZA: DATA ☐ / ☐ / ☐N. PROTOCOLLO ☐

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) BIAGI ELENA 3) MASOTTI LEONARDO
2) BRESCHI LUCA 4) SCABIA MARCO

PRIORITA'

Nazione o
organizzazione

Tipo di priorità

numero di domanda

data di de

1)

2)

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

NESSUNA

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1)	<input checked="" type="checkbox"/>	PROV	<input type="checkbox"/> n. pag	<input type="checkbox"/> 18	riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
Doc. 2)	<input checked="" type="checkbox"/>	PROV	<input type="checkbox"/> n. tav	<input type="checkbox"/> 04	disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
Doc. 3)	<input type="checkbox"/>	RIS	<input checked="" type="checkbox"/>		lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale
Doc. 4)	<input type="checkbox"/>	RIS	<input type="checkbox"/>		designazione inventore
Doc. 5)	<input type="checkbox"/>	RIS	<input type="checkbox"/>		documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6)	<input type="checkbox"/>	RIS	<input type="checkbox"/>		autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7)	<input type="checkbox"/>				nominativo completo del richiedente

SCIoglimento RISERVE
Data N° protocollo

____/____/____/
____/____/____/
____/____/____/
____/____/____/
Confronta singole priorità
____/____/____/

8) attestati di versamento, totale lire DUECENTONOVANTUNO/80 291/80 ANNI 3 obbligatorio

COMPILATO IL 25/03/2003 FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)CONTINUA (SI/NO) ☒Dr. Luisa BACCARO MANNUCCIDEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA (SI/NO) ☒CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA ARTIGIANATO AGRICOLTURA DI FIRENZEcodice 48

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA

FI 2003A000077

Reg. A

L'anno DUEMILATRE

il giorno

VENTISEI

del mese di

01 MARZO

il (I) richiedente (I) sopraindicato (I) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 01 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE



L'UFFICIALE ROGANTE

A. RICHIEDENTE (I)

N.G.

<input type="checkbox"/>	Denominazione	_____	_____	<input type="checkbox"/>
	Residenza	_____	codice _____	
<input type="checkbox"/>	Denominazione	_____	_____	<input type="checkbox"/>
	Residenza	_____	codice _____	
<input type="checkbox"/>	Denominazione	_____	_____	<input type="checkbox"/>
	Residenza	_____	codice _____	
<input type="checkbox"/>	Denominazione	_____	_____	<input type="checkbox"/>
	Residenza	_____	codice _____	
<input type="checkbox"/>	Denominazione	_____	_____	<input type="checkbox"/>
	Residenza	_____	codice _____	
<input type="checkbox"/>	Denominazione	_____	_____	<input type="checkbox"/>
	Residenza	_____	codice _____	

E. INVENTORI DESIGNATI

	cognome nome		cognome nome
05	GRANCHI SIMONA		
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	

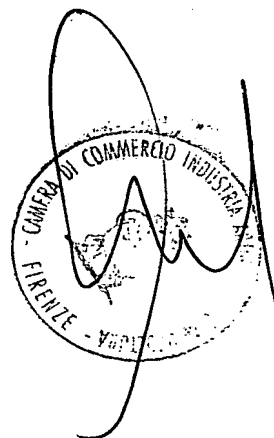
F. PRIORITA'

Nazione o organizzazione	Tipo di priorità	Numero di domanda	Data di deposito	Allegato S/R	SCIOGLIMENTO RISERVE	
					Data	N° protocollo
<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	___/___/___	_____
<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	___/___/___	_____
<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	___/___/___	_____
<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	___/___/___	_____
<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	___/___/___	_____
<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	___/___/___	_____

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

Dr. Luisa BACCARO MANNICCI

SPAZIO RISERVATO ALL'UFFICIO CENTRALE BREVETTI



RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA
NUMERO BREVETTO

2003A000077

REG. A

DATA DI DEPOSITO
DATA DI RILASCIO26 MAR. 2003
/ /

A. RICHIEDENTE (1)

Denominazione
ResidenzaACTIS S.R.L.
FIRENZE

D. TITOLO

METODO PER L'INDAGINE ECOGRAFICA TRAMITE MEZZI DI CONTRASTO

Classe proposta (sez./cl./scl/)

(gruppo sottogruppo)

L. RIASSUNTO

Viene descritto un metodo di indagine ecografica, in cui una porzione investigata di un corpo vivente viene raggiunta tramite circolazione sanguigna da un mezzo od agente di contrasto ecografico, iniettato in un vaso sanguigno, comprendente una pluralità di microbolle e detta porzione viene investita con un segnale ultrasonico di eccitazione ad una frequenza di eccitazione (f_0), ed in cui le microbolle investite dal segnale ultrasonico di eccitazione generano un segnale eco ad una frequenza diversa dalla frequenza di eccitazione, detto segnale venendo utilizzato per generare una immagine. Il segnale di eccitazione esercita su dette microbolle una pressione compresa tra 30 kPa e 1 MPa, le microbolle emettendo un segnale stabile ad almeno una subarmonica della frequenza di eccitazione, detto segnale stabile venendo elaborato per la generazione di immagini.

Fig.3



M. DISEGNO

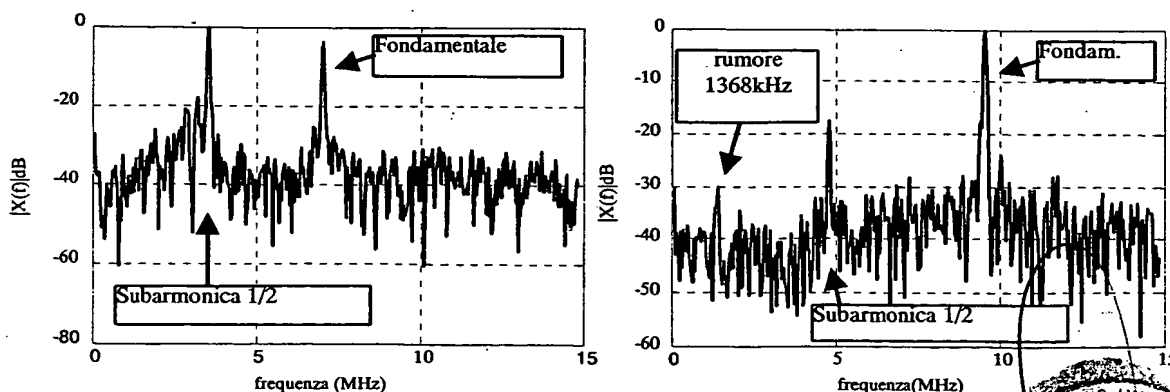
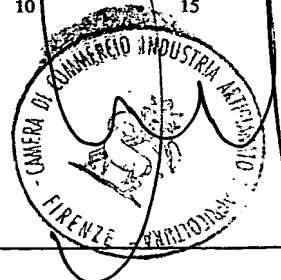


Fig.3



ACTIS ACTIVE SENSORS S.R.L. **F 2003A000077**

a Firenze

Metodo per l'indagine ecografica tramite mezzi di contrasto

5

DescrizioneCampo tecnico

La presente invenzione riguarda un nuovo metodo ed un nuovo dispositivo per eseguire indagini ecografiche tramite l'impiego di mezzi di contrasto costituiti da microbolle.

10

Stato della tecnica

Allo scopo di ottenere immagini ecografiche di vasi sanguigni od altri organi in esseri viventi è stata in anni relativamente recenti sviluppata una metodica che fa uso di mezzi od agenti di contrasto ecografici. In estrema sintesi, la tecnica si basa sull'iniezione nel paziente sottoposto ad esame di una sospensione di microbolle o di una sostanza che genera microbolle quando investita da un fronte d'onda ultrasonico.

15

20

In questi ultimi anni l'impiego di agenti di contrasto o mezzi di contrasto in campi diversi della diagnostica ad ultrasuoni ha prodotto un significativo miglioramento della qualità dell'immagine finale.

Molti gruppi di ricerca sono profondamente coinvolti nella caratterizzazione di agenti di contrasto al fine di

25

indagare sui meccanismi di interazione con ultrasuoni. Le osservazioni sugli agenti di contrasto con microscopio ottico e lo sviluppo di modelli teorici ha prodotto interessanti risultati riguardo il comportamento fisico delle microbolle, come l'agglomerazione e la frammentazione di microbolle, anche se questi risultati possono essere solo in parte applicati ad un miglioramento della qualità dell'immagine ad ultrasuoni. Si può affermare che soltanto i risultati ottenuti attraverso l'osservazione ad ultrasuoni dell'agente di contrasto sotto differenti condizioni di insonificazione ha prodotto criteri fondamentali in grado di proporre tecniche innovative di immagini ad ultrasuoni.

Le microbolle investite da un fronte d'onda ultrasonico ad una determinata frequenza di eccitazione rispondono retropropagando un'eco a frequenza diversa rispetto a quella di eccitazione.

US-A-4,718,433 descrive un metodo di imaging ecografico per impiego in campo medico, che fa uso di un mezzo di contrasto di questo tipo. Perfezionamenti a questa metodica di indagine sono descritti nei brevetti USA 6,443,899; 6,221,017; 6,064,628; 6,034,922; 5,678,553, 5,410,516; 5,526,816 e 6,371,914. Il contenuto di questi brevetti è esplicitamente ed integralmente incorporato per riferimento nella presente descrizione, di cui fa

parte integrante.

Nelle applicazioni pratiche, si è riscontrato che il mezzo di contrasto investito da un'onda ultrasonica emette un segnale di eco stabile alla prima armonica, cioè ad una frequenza doppia di quella di eccitazione. Benché la loro esistenza sia stata riportata in letteratura ed in particolare nei brevetti statunitensi sopra richiamati, le emissioni alle subarmoniche non sono mai risultate stabili e quindi non vengono utilizzate nelle applicazioni pratiche.

Nei primi tentativi di studio sono state utilizzate microbolle generate in un liquido, le quali hanno dato scarsi risultati all'atto pratico, a causa della loro instabilità. In tempi più recenti sono stati sviluppati mezzi di contrasto costituiti da microbolle rivestite da un guscio o membrana, che hanno dato migliori risultati grazie alla stabilità dell'emissione del segnale ecografico di risposta. Mezzi di contrasto per applicazioni in indagini ecografiche sono descritti nei seguenti brevetti

USA 6,485,705; 6,403,057; 6,333,021; 6,200,548;
 6,187,288; 6,183,725; 6,139,818; 6,136,293; 6,123,922;
 6,110,443; 5,961,956; 5,911,972; 5,908,610; 5,840,275;
 5,827,504; 5,686,060; 5,658,551; 5,597,549; 5,578,292;
 5,567,414; 5,556,610; 5,531,980; 5,445,813; 5,413,774;
 nonché nei brevetti europei 554,213, 474,833; 619743 e

nella pubblicazione internazionale WO-A-9409829. Il contenuto di queste pubblicazioni è incorporato integralmente nella presente descrizione e ne forma parte integrante.

5 Scopi e sommario dell'invenzione

Scopo della presente invenzione è la realizzazione di un metodo di indagine ecografica tramite l'impiego di un mezzo di contrasto, che consenta di ottenere particolari risultati non ottenibili con i metodi tradizionali.

10 In sostanza l'invenzione prevede un metodo di indagine ecografica, in cui una porzione investigata di un corpo vivente viene raggiunta tramite circolazione sanguigna da un mezzo od agente di contrasto ecografico, iniettato in un vaso sanguigno, comprendente una pluralità
15 di microbolle e detta porzione viene investita con un segnale ultrasonico di eccitazione ad una frequenza di eccitazione, ed in cui le microbolle investite dal segnale ultrasonico di eccitazione generano un segnale eco ad una frequenza diversa dalla frequenza di eccitazione, detto
20 segnale venendo utilizzato per generare una immagine. Caratteristicamente, secondo l'invenzione, il segnale di eccitazione esercita su dette microbolle una pressione compresa tra 30 kPa e 1 MPa, così che le microbolle emettono un segnale stabile ad almeno una subarmonica oltre
25 che ad armoniche della frequenza di eccitazione, detto



segnale stabile venendo elaborato per la generazione di immagini. Preferibilmente, la pressione esercitata dalle onde ultrasoniche è compresa tra 40 e 900 kPa e ancora più preferibilmente 60 e 500 kPa. In una forma di attuazione preferita, la pressione è tra 60 e 200 kPa.

Nei metodi ecografici tradizionali il segnale ultrasonico di eccitazione è costituito da un impulso, o cosiddetto burst, costituito da un numero molto ridotto di cicli di un segnale periodico, tipicamente un segnale sinusoidale. Normalmente vengono previsti non più di dieci cicli e preferibilmente meno di cinque cicli. Si è ora rilevato che, viceversa, per provocare una emissione stabile ad una subarmonica della frequenza di eccitazione, le microbolle è particolarmente vantaggioso che il segnale di eccitazione contenga più di cinque e preferibilmente più di otto ed ancora più preferibilmente un numero superiore a dieci cicli del segnale periodico. Un segnale di eccitazione di questo tipo ha un effetto di <<pompaggio>> delle microbolle, le quali dopo i primi cicli del segnale di eccitazione iniziano ad emettere l'eco alla subarmonica del segnale di eccitazione.

Secondo un diverso aspetto, la presente invenzione riguarda un metodo di indagine ecografica, in cui una porzione investigata di un corpo vivente viene raggiunta tramite circolazione sanguigna da un mezzo od agente di

contrasto ecografico, iniettato in un vaso sanguigno, comprendente una pluralità di microbolle e detta porzione viene investita con un segnale ultrasonico di eccitazione ad una frequenza di eccitazione ed in cui le microbolle
5 investite dal segnale ultrasonico di eccitazione generano un segnale eco ad una frequenza diversa dalla frequenza di eccitazione, detto segnale venendo utilizzato per generare una immagine. Caratteristicamente, il segnale di eccitazione esercita su dette microbolle una pressione
10 sufficiente a provocarne la rottura, durante la rottura venendo generato un segnale ecografico contenente una distribuzione spettrale alla frequenza di eccitazione, alle sue subarmoniche ed alle sue ultra-armoniche, detto segnale venendo filtrato per estrarre da esso il contenuto
15 spettrale ad almeno due di dette ultra-armoniche e subarmoniche. In pratica il segnale viene di preferenza filtrato per estrarre da esso tutti i picchi di frequenza a una o più subarmoniche, armoniche o ultra-armoniche e l'insieme di queste informazioni viene utilizzato per la
20 ricostruzione di immagini ecografiche o per l'estrazione di informazioni sui tessuti sotto esame.

Ulteriori vantaggiose caratteristiche del metodo secondo l'invenzione sono indicate nelle allegate rivendicazioni dipendenti.

25 L'invenzione riguarda anche un'apparecchiatura eco-

grafica corredata di una sonda ecografica e di idonei mezzi per la ricostruzione delle immagini ecografiche, la quale è programmata per generare segnali ecografici di eccitazione del tipo sopra descritto e per utilizzare il
5 segnale alla frequenza di almeno una subarmonica della frequenza di eccitazione.

Breve descrizione dei disegni

Il trovato verrà meglio compreso seguendo la descrizione e l'unito disegno, il quale mostra alcuni diagrammi
10 e risultati ottenuti con il metodo secondo l'invenzione. Più in particolare: la

Fig.1 mostra in istanti temporali successivi l'andamento temporale ed il contenuto spettrale del segnale ecografico ottenuto su una bolla d'aria in acqua
15 investita da un segnale ultrasonico di eccitazione;

Fig.2 mostra il segnale ecografico ottenuto da una microbolla di un mezzo di contrasto SONOVUE® di produzione Bracco International BV, Paesi Bassi, a vari valori della pressione acustica; la

20 Fig.3 mostra due spettri di emissione ottenuti con lo stesso mezzo di contrasto a due diverse frequenze di eccitazione; e la

Fig.4 mostra una rappresentazione B-mode di un tubo in materiale plastico contenente un liquido e un mezzo di
25 contrasto, rispettivamente alla frequenza fondamentale,

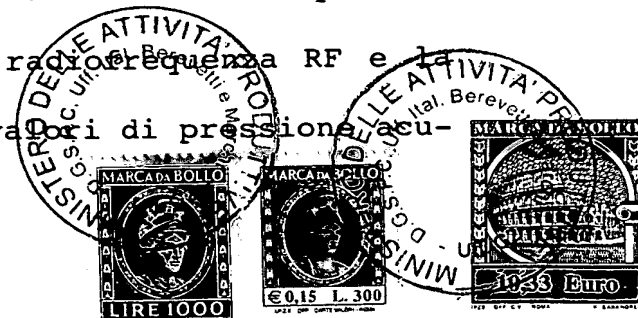
cioè alla frequenza del segnale di eccitazione, ed alla subarmonica.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Nei diagrammi di Fig.1 viene presentato il comporta-
 5 mento di una singola bolla d'aria durante la rottura. La bolla d'aria in esame è prodotta per cavitazione per mezzo di iniezione di acqua attraverso un ago a foro piccolo. In questo modo vengono prodotte bolle di diametro compreso nell'intervallo 10-100 μ m. La disposizione sperimentale è costituita da una piattaforma di acquisizione di immagini a radiofrequenza, insieme con l'ecografo Esa-
 10 ote Megas con una sonda ecografica a cortina fasata a 3.3MHz. In particolare, la piattaforma utilizzata è una piattaforma "FEMMINA", descritta in Scabia, M.; Biagi, E., Masotti L. <<Hardware and software platform for real-time processing and visualization of echographic radiofrequency signals>>, in IEEE Trans. Ultrason. Ferroelect. Freq. Contr., 49, (2002), 1444-1452.

Le bolle vengono insonificate ad alta pressione acustica (2Mpa-3Mpa) e viene osservato il comportamento di
 20 una particolare bolla.

In Fig.1 sono riportati, cinque istanti temporali successivi in una sequenza temporale di durata complessiva di 0.8 secondi, i segnali di radiofrequenza RF e la
 25 loro distribuzione spettrale. Ai valori di pressione ac-



stica impiegati si provoca il collasso o flash della bolla, che emette con un tipico contenuto spettrale a <pettine>. In particolare durante la fase di distruzione appaiono subarmoniche di diverso ordine e componenti ultrarmoniche.

Nella successiva Fig.2 è mostrato il risultato ottenuto con la stessa apparecchiatura ed un agente o mezzo di contrasto SONOVUE[®], ancora analizzando la risposta di una singola bolla. L'agente di contrasto SONOVUE[®] è ottenibile dalla BRACCO International SA, Paesi Bassi ed è realizzato secondo gli insegnamenti dei brevetti EP-B-474833, EP-B-554213, EP-B-619743.

Nei diagrammi di sinistra della Fig.2 è riportato l'andamento temporale del segnale di risposta, mentre nei diagrammi di destra è riportato l'andamento dello spettro di frequenze per diverse condizioni di eccitazione.

Il segnale di eccitazione è costituito in tutti i casi da un impulso o burst di eccitazione costituito da trenta cicli a 3,3 MHz di frequenza (frequenza di eccitazione f_0). Dall'alto verso il basso i quattro diagrammi mostrano la risposta ecografica della singola bolla di mezzo di contrasto a varie ampiezze del segnale di eccitazione cioè in definitiva a varie pressioni di eccitazione. Nel primo diagramma la pressione di eccitazione è

pari a 35 kPa. Come si osserva dal diagramma di destra, la risposta non presenta armoniche o subarmoniche, bensì solo un picco alla frequenza fondamentale di 3,3MHz.

Nel secondo caso la pressione di eccitazione è pari
5 a 80kPa. Si osserva una emissione stabile alla frequenza fondamentale ed alla subarmonica $1/2f_0$.

Aumentando ulteriormente l'ampiezza del segnale di eccitazione e quindi la pressione fino a 980 kPa, nella terza coppia di diagrammi si nota la presenza della sola
10 frequenza fondamentale f_0 e dell'armonica $2f_0$, mentre non si nota alcuna retropropagazione alle subarmoniche.

A pressioni acustiche sufficientemente elevate si provoca la rottura delle microbolle. Questa situazione si osserva nella quarta coppia di diagrammi, dove la pres-
15 sione è dell'ordine di 1,5 MPa. Quando viene impiegato un segnale di eccitazione di questo livello, la distruzione della microbolla provoca una emissione di ultrasuoni retrodiffusi con uno spettro a pettine, in cui si possono individuare oltre alla frequenza fondamentale ed alla se-
20 conda armonica, una subarmonica a $1/2f_0$ ed una ultra-armonica a $3/2f_0$.

In definitiva, i diagrammi della Fig.2 dimostrano che le microbolle SONOVUE® presentano emissioni subarmoniche stabili a bassi livelli di pressione (80kPa) con un
25 numero di cicli dell'impulso maggiore di 8-10. Quando la

bolla viene insonificata con un livello alto di pressione (980kPa) lo spettro subarmonico sparisce. Per la prima volta è stato osservato che l'emissione subarmonica è controllata da due soglie di pressione: la prima è associata alla sua generazione mentre l'altra determina la sua scomparsa, come è mostrato in Fig. 2 dove il segnale a RF retropropagato dalla bolla è rappresentato con la sua distribuzione spettrale. Il segnale a RF e il suo spettro riportati in fondo alla Fig. 2 sono riferiti alla distruzione della bolla e soltanto in questo attimo lo spettro della subarmonica appare per un brevissimo intervallo.

In Fig. 3 sono mostrati gli spettri di emissione stabile subarmonica a bassa pressione e con un impulso di eccitazione a due diverse frequenze centrali, pari a 7 MHz e 9,5 MHz. Una quantità di SONOVUE® pari a 0.01 ml disperso in un litro di acqua è stato utilizzato per questa misurazione. Sono stati impiegati trasduttori mono-elemento come trasmittitore e un ricevitore con un generatore di segnale Toellner toe 7708° come generatore di impulsi. L'unità ricevente era l'amplificatore Panametrics 5052PR connesso con la piattaforma di acquisizione ecografica per l'acquisizione e l'elaborazione dei segnali. Sulla sinistra, in Fig. 3, è riportata la distribuzione spettrale ottenuta usando un trasduttore a monoelemento

MHz Gilardoni come elemento trasmittente e una Panametrics V382, 3,5 MHz come ricevente.

Sulla destra, in Fig. 3 è riportato lo spettro ottenuto con un trasduttore di trasmissione Panametrics V311, 10 Mhz e un Gilardoni 5 MHz come elemento ricevente.

Il segnale di eccitazione utilizzato è stato un impulso o burst sinusoidale di durata pari a 10 microsecondi, contenente 50 cicli, ad una pressione di 70 kPa. In entrambi i diagrammi si evidenzia una risposta ad una frequenza pari alla frequenza di eccitazione e alla subarmonica $1/2f_0$.

Utilizzando il segnale retropropagato dall'agente di contrasto alla subarmonica della frequenza di eccitazione si ottengono immagini con un elevato contrasto.

Le immagini mostrate in Fig. 4 sono state ottenute usando un Linear Array Esaote LA523 con un hardware Esaote MEGAS front end, connesso alla piattaforma di acquisizione delle immagini RF. L'oggetto campione era costituito da un tubo di plastica riempito con SONOVUE® in acqua in concentrazione pari a 0,05 ml per litro di acqua e immerso in un fluido assorbente e diffondente per simulare l'attenuazione del tessuto biologico molle. L'immagine subarmonica riportata sulla destra in Fig. 4 è ottenuta da un filtro di Hanning con 91 prese centrato sulla frequenza subarmonica. Questa immagine mostra un contrasto



molto alto rispetto al tessuto simulato, infatti il segnale retrodiffuso dal tubo contenente il fluido e dal fluido assorbente circostante è completamente eliminato.

Ciò può essere assunto come una ulteriore conferma
5 che l'emissione subarmonica è un effetto peculiare della microbolla mentre nessun contributo subarmonico è derivato dal simulatore di tessuto.

In definitiva, una evoluzione completa della microbolla fino alla rottura e alla scomparsa è stata presentata in varie condizioni di misura. La visualizzazione
10 simultanea di immagini multiple per parametri ultrasonici differenti ha permesso di scoprire e di sottolineare alcuni specifici effetti in relazione con la dinamica di interazione tra microbolle e ultrasuoni. E' stato verificato che la creazione della subarmonica è un fenomeno con
15 soglia di pressione ultrasonica. In particolare è stato dimostrato che valori anche molto bassi di pressione attivano l'emissione di subarmonica.

Inoltre è stata osservata la stabilità
20 dell'emissione subarmonica a questi bassi livelli di pressione. Un importante parametro per l'emissione di subarmonica è anche il numero di cicli sinusoidali dell'impulso di eccitazione. Da questi risultati consegue che è necessario usare un numero di cicli più grande di
25 otto-dieci per generare subarmonica.

Seguendo le dinamiche di una singola bolla sono stati scoperti i diversi comportamenti di SONOVUE® e delle bolle d'aria, che a loro volta mostrano una tipica frammentazione spettrale a <pettine>. Per quel che concerne le tecniche di immagine tramite gli agenti di contrasto, il risultato più importante ottenuto è stata la stabilità dell'emissione di subarmonica e il suo verificarsi a bassi livelli di pressione. Infatti, considerando che i tessuti biologici non mostrano emissioni subarmoniche mentre generano una risposta di seconda armonica, si prevedono sviluppi futuri di tecniche di elaborazione di segnali molto interessanti.

Rivendicazioni

1. Un metodo di indagine ecografica, in cui una porzione investigata di un corpo vivente viene raggiunta tramite circolazione sanguigna da un mezzo od agente di
5 contrasto ecografico, iniettato in un vaso sanguigno, comprendente una pluralità di microbolle e detta porzione viene investita con un segnale ultrasonico di eccitazione ad una frequenza di eccitazione (f_0), ed in cui le microbolle investite dal segnale ultrasonico di eccitazione
10 generano un segnale eco ad una frequenza diversa dalla frequenza di eccitazione, detto segnale venendo utilizzato per generare una immagine, caratterizzato dal fatto che detto segnale di eccitazione esercita su dette microbolle una pressione compresa tra 30 kPa e 1 MPa, le microbolle emettendo un segnale stabile ad almeno una sub-
15 armonica della frequenza di eccitazione, detto segnale stabile venendo elaborato per la generazione di immagini.

2. Metodo come da rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detto segnale di eccitazione esercita su
20 dette microbolle una pressione compresa tra 40 e 900 kPa e preferibilmente compresa tra 60 e 500 kPa ed ancora più preferibilmente compresa tra 60 e 200 kPa.

3. Metodo come da rivendicazione 1 o 2, caratterizzato dal fatto che detto segnale di eccitazione è co-
25 stituito da un segnale periodico contenente almeno 5 e

preferibilmente almeno 10 cicli.

4. Metodo come da rivendicazione 3, caratterizzato dal fatto che detto segnale di eccitazione è un segnale sinusoidale.

5. Metodo come da rivendicazione 3 o 4, caratterizzato dal fatto che detto segnale periodico di eccitazione contiene più di 10 cicli.

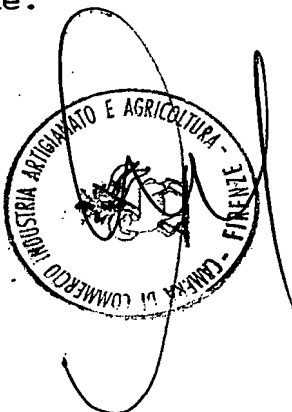
6. Metodo come da una o più delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che dette microbolle sono costituite da una membrana contenente un mezzo gassoso.

7. Un metodo di indagine ecografica, in cui una porzione investigata di un corpo vivente viene raggiunta tramite circolazione sanguigna da un mezzo od agente di contrasto ecografico, iniettato in un vaso sanguigno, comprendente una pluralità di microbolle e detta porzione viene investita con un segnale ultrasonico di eccitazione ad una frequenza di eccitazione (f_0) ed in cui le microbolle investite dal segnale ultrasonico di eccitazione generano un segnale eco ad una frequenza diversa dalla frequenza di eccitazione, detto segnale venendo utilizzato per generare una immagine, caratterizzato dal fatto che detto segnale di eccitazione esercita su dette microbolle una pressione sufficiente a provocarne la rottura, durante la rottura venendo generato un segnale ecografico.




contenente una distribuzione spettrale alla frequenza di
eccitazione, alle sue subarmoniche ed alle sue ultra-
armoniche, detto segnale venendo filtrato per estrarre da
esso il contenuto spettrale ad almeno due di dette ultra-
5 armoniche e subarmoniche.

8. Metodo come da una o più delle rivendicazioni
precedenti, caratterizzato dal fatto di rappresentare si-
multaneamente su uno schermo una pluralità di immagini
ricavate in istanti temporali successivi del segnale eco-
10 grafico, od in punti spazialmente separati di detta por-
zione sotto esame.



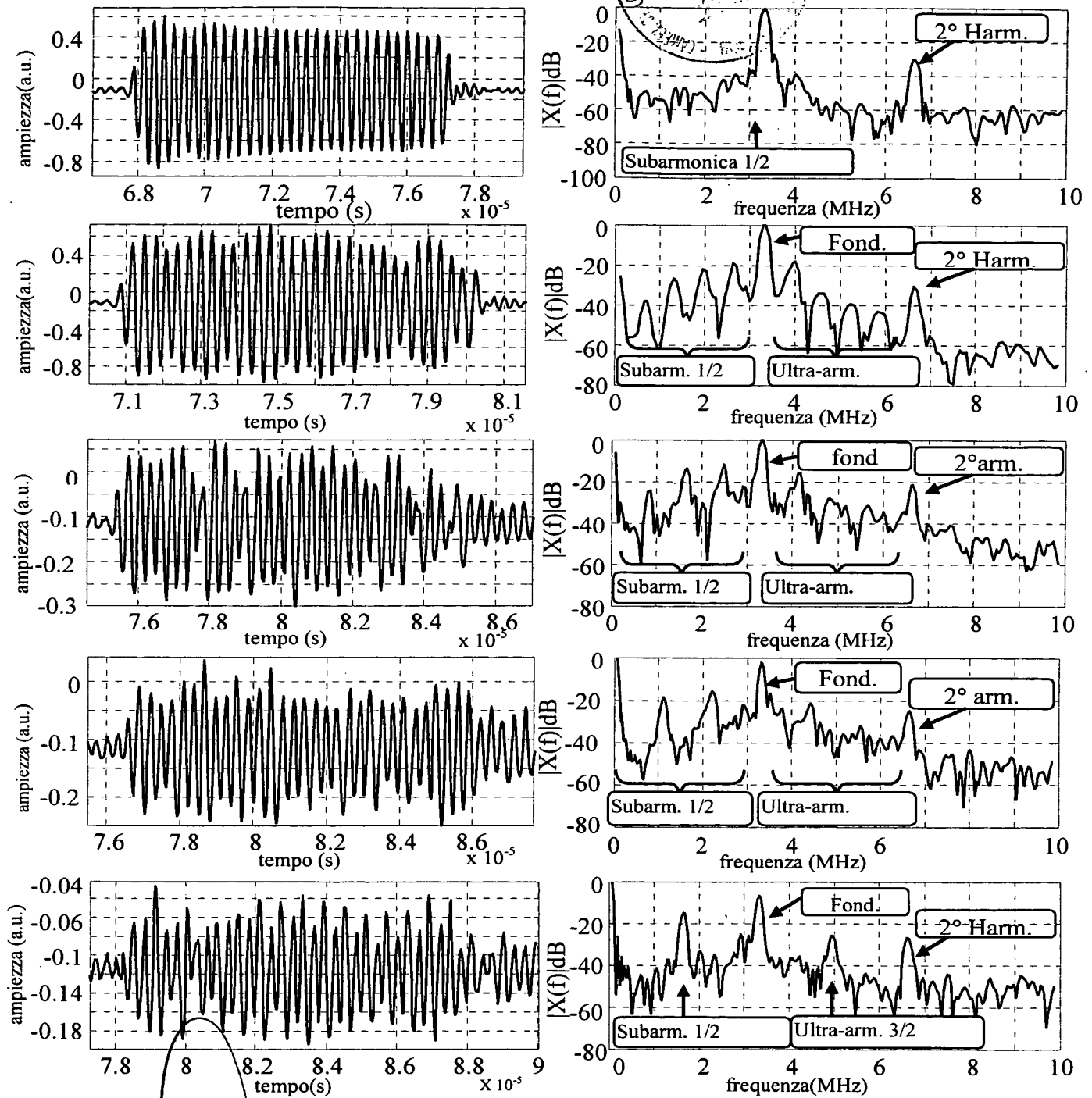
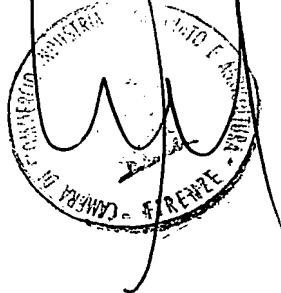
FIRENZE 23 MAR. 2003


Dr. Luisa BACCARO MANNUCCI
N. 489 Ordine Consulenti

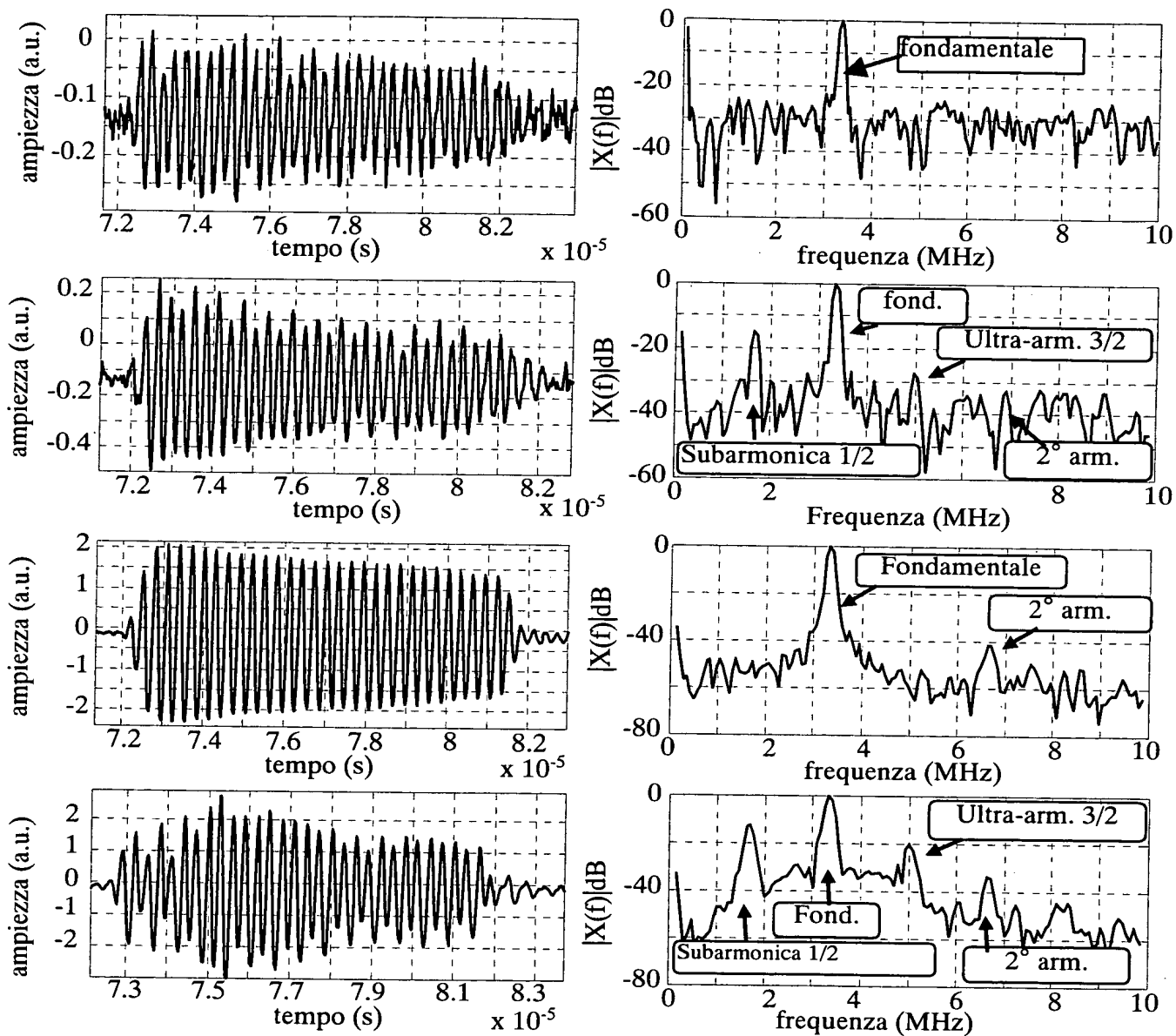
1/4

FL 2003A000077

Actis

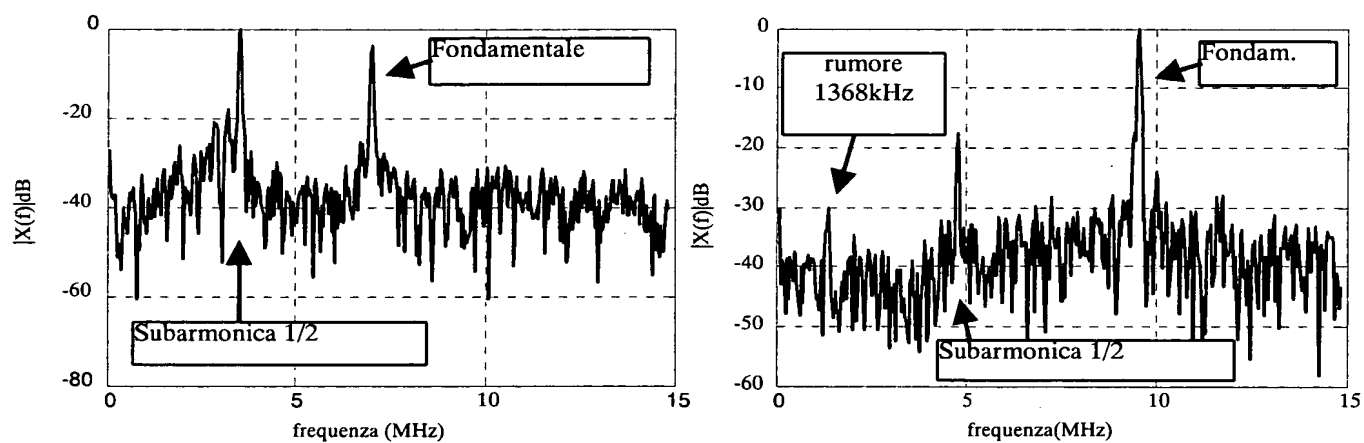
**Fig.1**

Luigi Baccaro Mannucci
 Dr. Luisa BACCARO MANNUCCI
 N. 189 Ordine Consulenti

**Fig.2**

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]
 Dr. Luisa MARINO MAMMUTTI
 N. 189 Ordine Consulenti

**Fig.3**

Luca
 Dr. Luisa BACCARO MANTUANI
 N. 189 Ordine Consulenti

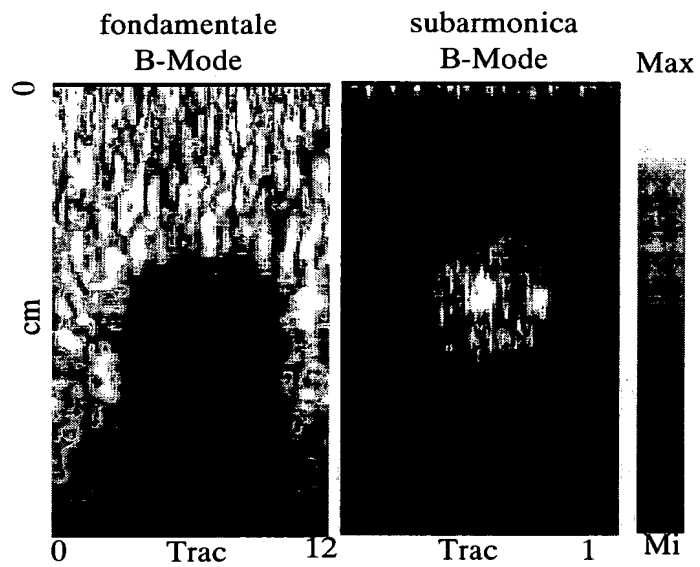


Fig.4

Dr. Luisa DALL'ACQUA MANNI
N. 189 Ordine Consulenti

MINISTRY OF PRODUCTIVE ACTIVITIES
General Management for Production Development and Competition
Italian Patent and Trademark Office
Office G2



Authentication of a copy of documents concerning the application for a patent for an industrial
invention No. **FI2003 A 000077** of **26.03.2003**

It is hereby declared that the attached copy is a true copy of the documents originally filed with
the above specified patent application, the details of which are stated in the enclosed filing record.

Rome, **12 AUG. 2004**

The Manager of the Department
Dr. Polito GALLOPPO
(Signature)

(Seal)

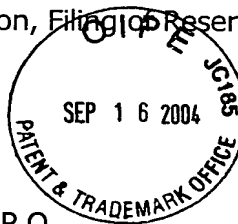
TO THE MINISTRY OF INDUSTRY COMMERCE AND CRAFTS
Italian Patent and Trademark Office - Rome
Utility Model Application for Industrial Invention, Filing of Reserves,

MOD. A.

A. APPLICANT(S)

1) Name **ACTIS ACTIVE SENSORS S.R.L.**
Seat **FIRENZE - VIA MASSONI 6/9**

2) Name
Seat



Code **022865000489**

Code

B. APPLICANT'S REPRESENTATIVE AT THE C.P.O.

Surname name **Dr. Luisa BACCARO MANNUCCI "and other"** Fiscal Code

Name of the office **UFFICIO TECNICO ING. A. MANNUCCI**

Via della Scala n. 4 city **FIRENZE** Cap. 50123 (Prov.) **FI**

C. ELECTIVE DOMICILE OF DESTINATION: **c/o Ufficio Tecnico Ing. A. MANNUCCI**

Via della Scala n.4 city **FIRENZE** Cap **50123** (Prov.) **FI**

D. TITLE Proposed Classes (section/class/sub-class) group/sub/group

"ECHOGRAPHIC EXAMINATION METHOD USING CONTRAST MEDIA"

ANTICIPATED LAY-OUT TO THE PUBLIC SI NO X IF PETITION: DATE FILE N.

E. DESIGNATED INVENTORS Surname Name Surname Name

1) **BIAGI ELENA**

3) **MASOTTI LEONARDO**

2) **BRESCHI LUCA**

4) **SCABIA MARCO**

F. PRIORITY

Nation and organization Kind of priority Application number Annulment reserve

1)

2)

Stamp of the Ministry of
Industry Commerce and Crafts
for true and faithful copy

G. AUTHORIZED CENTRE FOR COLLECTION OF CULTURES OF MICRO-ORGANISMS

H. SPECIAL NOTES

NONE

€ 10,33 for UPICA secretary
rights as per separate receipt

ANNEXED DOCUMENTS

N. Copies

Annulment reserve

Doc. 1) **1** Prov. n. pages **18** abstract with main drawing, description and claims (1 copy obl.) Date File N.

Doc. 2) **1** Prov. n. tabl. **04** drawing (obligatory if cited in description, 1 copy)

Doc. 3) **0** Res. **X** power of attorney, proxy of reference to general proxy

Doc. 4) **0** Res. designation of inventor

Doc. 5) **0** Res. priority documents with Italian Translation comparing single

Doc. 6) **0** Res. authorization or deed of assignment priorities

Doc. 7) **0** complete name of applicant

Doc. 8) Certificates of payment, total **EURO 291,80 for THREE YEARS** (obl)

FILLED IN **25.03.2003** SIGNATURE OF APPLICANT(S) **BACCARO MANNUCCI DR. LUISA**

CONTINUED YES/NO YES

CERTIFIED COPY OF THE PRESENT DEED IS REQUESTED YES/NO YES

PROVINCIAL OFFICE INDUSTRY COMMERCE AND CRAFTS OF FIRENZE

CODE 48

FILING RECORD APPLICATION NUMBER **FI2003A000077** REG. **A**

The year **2003** the day **26** of the month of **March**

the above applicant(s) has (have) presented to me the undersigned this application, consisting of
n. 0 additional sheets for the granting of the above patent

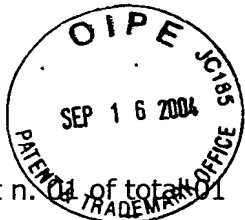
I. VARIUOS NOTES OF THE DRAFTING OFFICIAL : NONE

THE DEPOSITOR

Martina Capannoli Gherardi

THE DRAFTING OFFICIAL

(signature)



ADDITIONAL MOD. A

Additional sheet n. 01 of total 01 Application n. **FI2003A000077**

Reg. A

A. APPLICANT(S)

Name

Seat

Code

Name

Seat

Code

Name

Seat

Code

Name

Seat

Code

Name

Seat

Code

Name

Seat

Code

E. DESIGNATED INVENTORS

Surname Name

Surname Name

05	GRANCHI SIMONA		
----	----------------	--	--

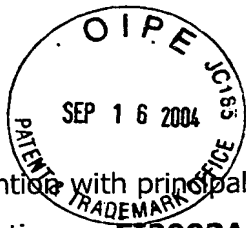
F. PRIORITY

Nation and organization Kind of priority Appl. number Date of filing Encls Annulment reserve

SIGNATURE OF APPLICANT(S) BACCARO MANNUCCI DR. LUISA

SPACE RESERVED TO THE PATENT AND TRADEMARKS OFFICE

stamp



Summary Invention with principal drawing, description and claims

Number Application **F12003A000077** REG. A

Filing Date 16.04.1999

Number Patent

Granting Date

A. APPLICANT(1)

1) Name **FABIO PERINI S.P.A.**Seat **LUCCA - LU****TITLE: "ECHOGRAPHIC EXAMINATION METHOD USING CONTRAST MEDIA"**

Proposed Class

(Group/undergroup)

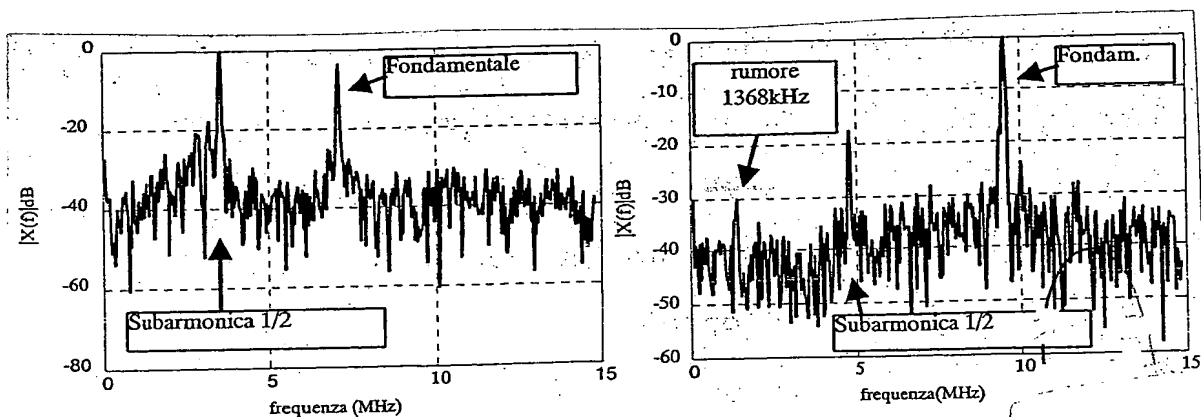
SUMMARY:

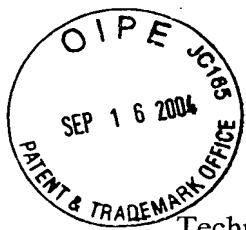
What is described is an echographic examination method, in which an echographic contrast medium or agent, injected into a blood vessel and comprising a plurality of microbubbles, is sent by means of the blood circulation to a part of a living body under investigation and said part is struck by an ultrasonic excitation signal at an excitation frequency (f_0), and in which the microbubbles struck by the ultrasonic excitation signal generate an echo signal at a frequency different from the excitation frequency, said signal being used to generate an image. The excitation signal exerts a pressure of 30 kPa to 1 MPa on said microbubbles, the microbubbles emitting a stable signal at not less than one subharmonic of the excitation frequency, said stable signal being processed to generate images.

Fig. 3

DRAWING:

=====

**Fig.3**



Echographic examination method using contrast media

DESCRIPTION

Technical field

5

The present invention relates to a new method and a new device for carrying out echographic examinations using a contrast medium consisting of microbubbles.

Prior art

10

A procedure making use of echographic means or agents has been developed comparatively recently for the purpose of obtaining echographic images of blood vessels or other organs in living creatures. Very briefly, the method is based on the injection of a suspension of microbubbles, or of a substance which generates
15 microbubbles when struck by an ultrasonic wavefront, into the patient under examination.

20

In recent years, the use of contrast agents or contrast media in fields other than ultrasonic diagnosis has produced a significant improvement in the quality of the final image.

25

30

Many research teams have made considerable efforts to characterize contrast agents, with the aim of investigating the mechanisms of interaction with ultrasound. Observations of contrast agents under the optical microscope and the development of theoretical models have yielded useful results concerning the physical behavior of the microbubbles, such as the agglomeration and fragmentation of microbubbles, even if these results are only partially applicable to an improvement of the quality of the ultrasonic image. It can be stated that the results of the ultrasonic observation of the contrast agent in different conditions of sonication have been sufficient to produce fundamental criteria for the proposal of innovative ultrasonic imaging methods.

Microbubbles struck by an ultrasonic wavefront at a given excitation frequency respond by back-propagating an echo at a frequency different from the excitation

frequency.

US Patent n. 4,718,433 describes an echographic imaging method for application in the medical field, which makes use of a contrast medium of this type.

5 Improvements to this examination method are described in US Patents 6,443,899; 6,221,017; 6,064,628; 6,034,922; 5,678,553; 5,410,516; 5,526,816 and 6,371,914. The entire content of these patents is expressly incorporated by reference in the present description, of which it is an integral part.

10 In practical applications, it has been found that the contrast medium struck by an ultrasonic wave emits a stable echo signal at the first harmonic, in other words at a frequency twice the excitation frequency. Although their existence has been reported in the literature and particularly in the United States patents cited above, emissions at subharmonics have never proved to be stable and consequently they
15 are not used in practical applications.

Initial stages of research used microbubbles generated in a liquid, but the results were of limited practical use because of their instability. More recently, contrast medium consisting of microbubbles surrounded with shells or membranes were
20 developed, and these gave better results because of the stability of the emission of the echographic response signal. Contrast medium for application in echographic examination are described in the following US Patents: 6,485,705; 6,403,057; 6,333,021; 6,200,548; 6,187,288; 6,183,725; 6,139,818; 6,136,293; 6,123,922; 6,110,443; 5,961,956; 5,911,972; 5,908,610; 5,840,275; 5,827,504; 5,686,060;
25 5,658,551; 5,597,549; 5,578,292; 5,567,414; 5,556,610; 5,531,980; 5,445,813; 5,413,774, and in European patents 554,213, 474,833, 619,743 and in international publication WO-A-9409829. The content of these publications is incorporated in full in the present description by reference and forms an integral part of it.

30 Objects and summary of the invention

The object of the present invention is to provide an echographic examination method using a contrast medium which makes it possible to obtain particular results which cannot be obtained with the conventional methods.

Essentially, the invention provides an echographic examination method in which an echographic contrast medium or agent, injected into a blood vessel and comprising a plurality of microbubbles, is sent by means of the blood circulation to a part of a living body under investigation and said part is struck by an ultrasonic excitation signal at an excitation frequency, and in which the microbubbles struck by the ultrasonic excitation signal generate an echo signal at a frequency different from the excitation frequency, said signal being used to generate an image. Characteristically, according to the invention, the excitation signal exerts a pressure of 30 kPa to 1 MPa on said microbubbles, so that the microbubbles emit a stable signal at one subharmonic at least, as well as at the harmonics of the excitation frequency, said stable signal being processed to generate images. Preferably, the pressure exerted by the ultrasonic waves is in the range from 40 to 900 kPa and even more preferably from 60 to 500 kPa. In a preferred embodiment, the pressure is in the range from 60 to 200 kPa.

The contrast medium can be one including microbubbles or that produces microbubbles upon exposure to ultrasound waves.

According to an aspect of the invention, the contrast medium is injected in a blood vessel of a patient in need of an ultrasound imaging investigation and an ultrasound image is generated using the subharmonic echo signal.

In another aspect, the present invention relates to an echographic examination method, in which an echographic contrast medium or agent, injected into a blood vessel and comprising a plurality of microbubbles, is sent by means of the blood circulation to a part of a living body under investigation, and said part is struck by an ultrasonic excitation signal at an excitation frequency, and in which the microbubbles struck by the ultrasonic excitation signal generate an echo signal at a frequency different from the excitation frequency, said signal being used to generate an image. Characteristically, the excitation signal exerts a pressure on said microbubbles sufficient to cause their rupture, and an echographic signal containing a spectral distribution at the excitation frequency, at its subharmonics and at its ultraharmonics is generated during the rupture, said signal being filtered

to extract the spectral content from it at least two of said ultraharmonics and subharmonics. In practice, the signal is preferably filtered to extract from it all the frequency peaks at one or more subharmonics, harmonics or ultraharmonics, and the set of these data is used for the reconstruction of echographic images or for the extraction of information on the tissues under examination.

Further advantageous characteristics of the method according to the invention are indicated in the attached dependent claims.

The invention also relates to an echographic apparatus provided with an echographic probe and suitable means for reconstructing the echographic images, this apparatus being programmed to generate echographic excitation signals of the type described above and to use the signal at the frequency of at least one subharmonic of the excitation frequency.

Brief description of the drawings

The invention will be more clearly understood with the aid of the description and the attached drawings, which show some diagrams and results obtained with the method according to the invention. More particularly,

Fig. 1 shows in successive instants of time the temporal variation and the spectral content of the echographic signal obtained from an air bubble in water struck by an ultrasonic excitation signal;

Fig. 2 shows the echographic signal obtained from a microbubble of a Sonovue® contrast medium produced by Bracco International BV, Netherlands, at different values of acoustic pressure;

Fig. 3 shows two emission spectra obtained with the same contrast medium at two different excitation frequencies; and

Fig. 4 shows a B-mode representation of a plastic tube containing a liquid and a contrast medium, at the fundamental frequency, in other words the excitation signal frequency, and the subharmonic respectively.

Detailed description of the invention

The diagrams in Fig. 1 show the behavior of a single air bubble during rupture. The air bubble under examination is produced by cavitation by injecting water through a needle with a fine aperture. This produces bubbles with diameters ranging from 10 to 100 μm . The experimental set-up consists of a radio frequency image acquisition platform, combined with the Esaote Megas echograph with a 3.3 MHz phased array echographic probe. In particular, the platform used is a “FEMMINA” platform, described in M. Scabia, E. Biagi, and L. Masotti,
5 Hardware and software platform for real-time processing and visualization of echographic radiofrequency signals, in IEEE Trans. Ultrason. Ferroelect. Freq. Contr., 49, (2002), 1444-1452.

The bubbles are sonicated at high acoustic pressure (2 MPa – 3 MPa) and the
15 behavior of one particular bubble is observed.

Fig. 1 shows five successive instants of time in a temporal sequence having a total duration of 0.8 seconds, the radio frequency signals RF and their spectral distribution. At the acoustic pressure values which are used, the bubble is made to
20 collapse or flash, emitting with a typical “comb-like” spectral content. In particular, subharmonics of different orders and ultraharmonic components appear in the destruction phase.

The following figure, Fig. 2, shows the result obtained with the same apparatus and a Sonovue® contrast medium or agent, again by analyzing the response of a
25 single bubble. The Sonovue® contrast agent is available from Bracco International SA, the Netherlands, and is produced according to the teachings of patents EP-B-474833, EP-B-554213 and EP-B-619743.

30 The diagrams on the left in Fig. 2 show the temporal variation of the response signal, while the diagrams on the right show the variation of the frequency spectrum for different excitation conditions.

The excitation signal consists in all cases of an excitation pulse or burst consisting

of thirty cycles at a frequency of 3.3 MHz (excitation frequency f_0). Reading downward, the four diagrams show the echographic response of the single bubble of contrast medium at different amplitudes of the excitation signal, in other words at different excitation pressures. In the first diagram, the excitation pressure is 35 kPa. As seen in the diagram on the right, the response contains no harmonics or subharmonics, but only a peak at the fundamental frequency of 3.3 MHz.

In the second case, the excitation pressure is 80 kPa. A stable emission is observed at the fundamental frequency and at the subharmonic $1/2f_0$.

When the amplitude of the excitation signal is increased further until the pressure is raised to 980 kPa, as shown in the third pair of diagrams, only the fundamental frequency f_0 and the harmonic $2f_0$ are present, while no back-propagation is seen at the subharmonics.

At sufficiently high acoustic pressures, the microbubbles are ruptured. This situation is seen in the fourth pair of diagrams, where the pressure is of the order of 1.5 MPa. When an excitation signal at this level is used, the destruction of the microbubble causes an emission of back-scattered ultrasound with a comb-like spectrum, in which a subharmonic at $1/2f_0$ and an ultraharmonic at $3/2f_0$ can be identified in addition to the fundamental frequency and the second harmonic.

Overall, the diagrams of Fig. 2 show that the Sonovue® microbubbles have stable subharmonic emissions at low pressure levels (80 kPa). When the bubble is sonicated with a high pressure level (980 kPa), the subharmonic spectrum disappears. It was found for the first time that the subharmonic emission is controlled by two pressure thresholds, the first being associated with its generation, while the second causes its disappearance, as shown in Fig. 2 where the RF signal back-propagated from the bubble is shown with its spectral distribution. The RF signal and its spectrum shown at the bottom of Fig. 2 refer to the destruction of the bubble and the subharmonic spectrum appears only at this moment for a very short interval.

Fig. 3 shows the subharmonic stable emission spectra at low pressure and with an

excitation pulse at two different central frequencies, 7 MHz and 9.5 MHz. 0.01 ml of Sonovue® dispersed in a liter of water was used for this measurement. Single-element transducers were used as the transmitter and a receiver with a Toellner TOE 7708° as a pulse generator. The receiving unit was a Panametrics 5052PR
5 connected to the echographic acquisition platform for the acquisition and processing of the signals. The left-hand diagram in Fig. 3 shows the spectral distribution obtained by using a Gilardoni 5 MHz single-element transducer as the transmitting element and a Panametrics V382 3.5 MHz device as the receiving element.

10

The right-hand diagram in Fig. 3 shows the spectrum obtained with a Panametrics V311 10 MHz transmission transducer and a Gilardoni 5 MHz device as the receiving element.

15

The excitation signal used was a sinusoidal pulse or burst with a duration of 10 microseconds, containing 50 cycles, at a pressure of 70 kPa. In both diagrams, a response is seen at a frequency equal to the excitation frequency and at a frequency equal to the subharmonic $1/2f_0$.

20

By using the signal back-propagated from the contrast agent at the subharmonic of the excitation frequency, high-contrast images can be obtained.

25

The images shown in Fig. 4 were obtained by using an Esaote LA523 linear array with Esaote MEGAS front end hardware, connected to the RF image acquisition platform. The specimen consisted of a plastic tube filled with Sonovue® in water at a concentration of 0.05 ml per liter of water and immersed in an absorbent and diffusing fluid to simulate the attenuation of soft biological tissues. The subharmonic image shown on the right in Fig. 4 was obtained from a 91-tap Hanning filter centered on the subharmonic frequency. This image shows a very
30 high contrast by comparison with the simulated tissue, since the signal back-scattered by the tube containing the fluid and by the surrounding absorbent fluid is completely eliminated.

This can be taken as a further confirmation that the subharmonic emission is a

peculiar effect of the microbubble, whereas no subharmonic contribution is derived from the tissue simulator.

5 In conclusion, a full development of the microbubble up to and including its rupture and disappearance was shown in various measurement conditions. The simultaneous visualization of multiple images for different ultrasonic parameters made it possible to discover and emphasize certain specific effects in relation to the dynamics of interaction between microbubbles and ultrasound. It was found that the creation of the subharmonic was a phenomenon with an ultrasonic pressure
10 threshold. In particular, it was demonstrated that even very low pressure levels activated the subharmonic emission.

The stability of the subharmonic emission at these low pressure levels was also observed.

15 Observation of the dynamics of a single bubble revealed the different behaviors of Sonovue® and the air bubbles, the latter showing a typical "comb-like" spectral fragmentation. As regards imaging methods using contrast agents, the most important result was the stability of the subharmonic emission and its occurrence
20 at low pressure levels. Indeed, given that biological tissues do not show subharmonic emissions while they generate a second harmonic response, very useful future developments of signal processing methods can be expected.

What we claim is:

1. Echographic examination method, in which an echographic contrast medium including microbubbles, or generating microbubbles upon exposure to ultrasonic waves, injected into a blood vessel, is sent by means of the blood circulation to a part of a living body under investigation and said part is struck by an ultrasonic excitation signal at an excitation frequency (f_0), and in which the microbubbles struck by the ultrasonic excitation signal generate an echo signal at a frequency different from the excitation frequency, said signal being used to generate an image, wherein said excitation signal exerts a pressure of 30 kPa to 1 MPa on said microbubbles, so that the microbubbles emit a stable signal at one subharmonic at least of the excitation frequency, said stable signal being processed to generate images.
2. Method according to Claim 1, wherein said excitation signal exerts a pressure in the range from 40 to 900 kPa, preferably from 60 to 500 kPa, and even more preferably from 60 to 200 kPa on said microbubbles.
3. Method according to Claim 1, wherein said excitation signal is a sinusoidal signal.
4. Method according to claim 1, wherein each of said microbubbles consists of a membrane containing a gaseous medium.
5. Method according to claim 2, wherein each of said microbubbles consists of a membrane containing a gaseous medium.
6. Method according to claim 3, wherein each of said microbubbles consists of a membrane containing a gaseous medium,
7. Method according to one or more of the preceding claims, wherein a plurality of images obtained at successive instants of time of the echographic signal, or at spatially distinct points of said part under examination, are displayed simultaneously on a screen.

8. Echographic examination method, in which an echographic contrast medium containing microbubbles or generating microbubbles upon exposure to ultrasonic waves, injected into a blood vessel, is sent by means of the blood circulation to a part of a living body under investigation and said part is struck by an ultrasonic excitation signal at an excitation frequency (f_0), and in which the microbubbles struck by the ultrasonic excitation signal generate an echo signal at a frequency different from the excitation frequency, said signal being used to generate an image, wherein said excitation signal exerts sufficient pressure on said microbubbles to cause their rupture, an echographic signal being generated during the rupture said signal containing a spectral distribution at the excitation frequency, at its subharmonics and at its ultraharmonics, said signal being filtered to extract the spectral content from it at at least two of said ultraharmonics and subharmonics.

9. Method according to claim 8, wherein a plurality of images obtained at successive instants of time of the echographic signal, or at spatially distinct points of said part under examination, are displayed simultaneously on a screen.

10. Ultrasonic method for imaging, in which an echographic contrast medium including microbubbles, or generating microbubbles upon exposure to ultrasonic waves, is introduced into a portion of a body under investigation and is struck by an ultrasonic excitation signal at an excitation frequency (f_0), and in which the microbubbles struck by the ultrasonic excitation signal generate an echo signal at a frequency different from the excitation frequency, said signal being used to generate an image, wherein said excitation signal exerts a pressure of 30 kPa to 1 MPa on said microbubbles, so that the microbubbles emit a stable signal at at least one subharmonic of the excitation frequency, said stable signal being processed to generate images.

11. Method according to claim 10, wherein said body is a living body.

12. Method according to claim 11, wherein said contrast medium or agent is injected into a blood vessel of said living body.

13. Method according to Claim 10 or 11 or 12, wherein said excitation signal exerts a pressure in the range from 40 to 900 kPa, preferably from 60 to 500 kPa, and even more preferably from 60 to 200 kPa on said microbubbles.

5 14. Method according to Claim 10, wherein said excitation signal is a sinusoidal signal.

15 15. Method according to Claim 11, wherein said excitation signal is a sinusoidal signal.

10 16. Method according to Claim 12, wherein said excitation signal is a sinusoidal signal.

15 17. Method according to Claim 13, wherein said excitation signal is a sinusoidal signal

18. Method according to claim 10 or 11 or 12 wherein each of said microbubbles consists of a membrane containing a gaseous medium.

20 19. Method according to claim 13, wherein each of said microbubbles consists of a membrane containing a gaseous medium.

25 20. Method according to claim 14, wherein each of said microbubbles consists of a membrane containing a gaseous medium,

21. Method according to claim 10, wherein a plurality of images obtained at successive instants of time of the echographic signal, or at spatially distinct points of said part under examination, are displayed simultaneously on a screen.

30 22. Ultrasonic method for imaging, in which an echographic contrast medium including microbubbles, or generating microbubbles upon exposure to ultrasonic waves, is introduced into a portion of a body under investigation and is struck by an ultrasonic excitation signal at an excitation frequency (f_0), and in which the microbubbles struck by the ultrasonic excitation signal generate an echo

signal at a frequency different from the excitation frequency, said signal being used to generate an image, wherein said excitation signal exerts sufficient pressure on said microbubbles to cause their rupture, an echographic signal being generated during the rupture said signal containing a spectral distribution at the excitation frequency, at its subharmonics and at its ultraharmonics, said signal being filtered to extract the spectral content from it at at least two of said ultraharmonics and subharmonics.

23. Ultrasonic imaging method, including the steps of:

- introducing a contrast medium including microbubbles, or generating microbubbles upon exposure to ultrasonic waves, in a portion under investigation of a body;
- striking said portion with an ultrasound excitation signal at an excitation signal, said microbubbles generating an echo signal at a frequency different from the excitation frequency;

wherein said excitation signal is controlled to exert a pressure on said microbubbles such that the microbubbles emit a stable signal at at least one subharmonic of said excitation frequency.

24. Method according to claim 23, wherein said excitation signal is controlled to exert a pressure between 30kPa and 1 Mpa on said microbubbles.

25. Method according to claim 23, wherein said excitation signal exerts a pressure in the range from 40 to 900 kPa, preferably from 60 to 500 kPa, and even more preferably from 60 to 200 kPa on said microbubbles.

26. Ultrasonic imaging method, including the steps of:

- injecting a contrast medium including microbubbles, or generating microbubbles upon exposure to ultrasonic waves, in a blood vessel of a patient;
- striking said microbubbles with an ultrasound excitation signal at an excitation signal, said microbubbles generating an echo signal at a frequency different from the excitation frequency;

wherein said excitation signal is controlled to exert a pressure on said microbubbles such that the microbubbles emit a stable signal at at least one

subharmonic of said excitation frequency.

27. Method according to claim 26, wherein said excitation signal is controlled to exert a pressure between 30kPa and 1 Mpa on said microbubbles.

5

28. Method according to claim 26, wherein said excitation signal exerts a pressure in the range from 40 to 900 kPa, preferably from 60 to 500 kPa, and even more preferably from 60 to 200 kPa on said microbubbles.

10

29. Ultrasonic imaging method, including the steps of:

- introducing a contrast medium including microbubbles, or generating microbubbles upon exposure to ultrasonic waves, in a portion under investigation of a body;
- striking said portion with an ultrasound excitation signal at an excitation signal, said microbubbles generating an echo signal at a frequency different from the excitation frequency;

15

wherein said excitation signal exerts sufficient pressure on said microbubbles to cause their rupture, an echographic signal being generated during the rupture said signal containing a spectral distribution at the excitation frequency, at its subharmonics and at its ultraharmonics, said signal being filtered to extract the spectral content from it at at least two of said ultraharmonics and subharmonics.

20

30. Ultrasonic imaging method, including the steps of:

- injecting a contrast medium including microbubbles, or generating microbubbles upon exposure to ultrasonic waves, in a blood vessel of a patient;
- striking said microbubbles with an ultrasound excitation signal at an excitation signal, said microbubbles generating an echo signal at a frequency different from the excitation frequency;

25

wherein said excitation signal exerts sufficient pressure on said microbubbles to cause their rupture, an echographic signal being generated during the rupture said signal containing a spectral distribution at the excitation frequency, at its subharmonics and at its ultraharmonics, said signal being filtered to extract the spectral content from it at at least two of said ultraharmonics and subharmonics.

30

31. An ultrasonic imaging system for imaging the harmonic response of a structure inside a body, including:

- means for transmitting ultrasonic energy into the body at an excitation frequency;
- 5 - means responsive to said transmitted ultrasonic energy, for receiving ultrasonic echo signals, generated by microbubbles of a contrast medium introduced into said body, at a subharmonic of said excitation frequency;
- means for producing an ultrasonic image from said echo signals;

wherein said excitation signal is controlled to exert a pressure on said
10 microbubbles, so that the microbubbles emit a stable signal at one subharmonic at least of the excitation frequency, said stable signal being processed to generate images.

32. System according to claim 31, wherein said excitation signal is controlled to exert on said microbubbles a pressure between 30 kPa and 1 MPa,
15 and preferably between 40 to 900 kPa, and more preferably from 60 to 500 kPa, and even more preferably from 60 to 200 kPa.

33. An ultrasonic imaging system for imaging the harmonic response of a structure inside a body, including:

- 20 - means for transmitting ultrasonic energy into the body at an excitation frequency;
- means responsive to said transmitted ultrasonic energy, for receiving ultrasonic echo signals, generated by microbubbles of a contrast medium introduced into said body, at a subharmonic of said excitation frequency;
- means for producing an ultrasonic image from said echo signals;

25 wherein said excitation signal exerts sufficient pressure on said microbubbles to cause their rupture, an echographic signal being generated during the rupture said signal containing a spectral distribution at the excitation frequency, at its subharmonics and at its ultraharmonics, said means responsive to said transmitted ultrasonic energy including a filter to extract the spectral content
30 from it at at least two of said ultraharmonics and subharmonics.